

# 洛美利嗪对糖尿病早期大鼠视网膜神经节细胞的保护作用

谷瑞东<sup>1</sup>, 郝莹莹<sup>2</sup>, 陈晓隆<sup>1</sup>

作者单位:(110000)中国辽宁省沈阳市,中国医科大学附属盛京医院<sup>1</sup>眼科;<sup>2</sup>妇产科

作者简介:谷瑞东,毕业于中国医科大学,现工作于沈阳市第四人民医院,眼科学博士,主治医师,研究方向:眼底病、眼外伤。

通讯作者:陈晓隆,教授,主任医师,博士研究生导师,研究方向:眼底病、眼外伤。chenxl@sj-hospital.org

收稿日期:2013-04-23 修回日期:2014-03-10

## Protective effects of lomerizine on retinal ganglion cells in early diabetic rats

Rui-Dong Gu<sup>1</sup>, Ying-Ying Hao<sup>2</sup>, Xiao-Long Chen<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology; <sup>2</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110000, Liaoning Province, China

Correspondence to: Xiao-Long Chen. Department of Ophthalmology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110000, Liaoning Province, China. chenxl@sj-hospital.org

Received:2013-04-23 Accepted:2014-03-10

## Abstract

• AIM: To investigate the neuroprotection of lomerizine (LOM) on retinal ganglion cells (RGCs) in early diabetic rats and their mechanism.

• METHODS: Adult male Sprague - Dawley (SD) rats were randomly divided into control (CON), diabetes mellitus (DM), lomerizine (LOM) group, and each group had 40 rats. Diabetes rat model was induced by Streptozotocin (STZ) of intraperitoneal injection of 60 mg/kg of disposable. In LOM group, after model was established, rats were lavaged LOM by the dosage of 60mg/kg daily, the CON group and DM group were given the same dosage sodium chloride. In 4<sup>th</sup>, 8<sup>th</sup>, 12<sup>th</sup> wk, RGCs' apoptosis were detected by HE, TUNEL, transmission electron microscope, and TUNEL and laser confocal microscope detection was used to test the calcium ion concentration.

• RESULTS: Morphological observation: with the extension of the DM, RGCs decreased gradually and appeared disordered arrangement of cells. In DM group, different stages of apoptosis were observed by transmission electron microscope and got worse gradually with its extension. In LOM group, compared with DM group in the same period, RGCs apoptosis signs diminished gradually at 8<sup>th</sup> and 12<sup>th</sup> wk. TUNEL detection: no apoptotic RGCs was observed in CON group. In DM group, few TUNEL positive RGCs were seen at 4<sup>th</sup> wk, and became more and more gradually.

The apoptosis index was significantly higher in DM group compared with CON group in same time and there was statistical significance ( $P < 0.01$ ). In LOM group at 8<sup>th</sup> and 12<sup>th</sup> wk, compared with DM group in the same period, the numbers of TUNEL positive RGCs decreased. The apoptosis index was significantly lower in LOM group compared with DM group in the same period ( $P < 0.01$ ). Calcium ion concentration detection by laser confocal microscope: compared with CON group in same time points, at 8<sup>th</sup> and 12<sup>th</sup> week, DM group's calcium fluorescent staining intensity of RGCs markedly elevated and had significant differences. ( $P < 0.01$ ). In LOM group, at 8<sup>th</sup> and 12<sup>th</sup> wk, calcium fluorescent staining intensity of RGCs markedly decreased and had statistical significance ( $P < 0.01$ ).

• CONCLUSION: The LOM played a protective role for RGCs in early stage of diabetic rats.

• KEYWORDS: diabetic retinopathy; retinal ganglion cells; apoptosis; calcium ion concentration; lomerizine

Citation: Gu RD, Hao YY, Chen XL. Protective effects of lomerizine on retinal ganglion cells in early diabetic rats. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2014;14(4):593-598

## 摘要

目的:探讨洛美利嗪(lomerizine, LOM)对糖尿病早期大鼠视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)凋亡的保护作用及其机制。

方法:SD大鼠随机分为对照组(CON)、糖尿病组(DM)及洛美利嗪组(LOM),每组40只大鼠。DM和LOM组链脲佐菌素(STZ)按60mg/kg一次性腹腔注射诱导糖尿病模型,CON组给予等量无菌柠檬酸钠溶液腹腔注射。LOM组于糖尿病鼠模型成模后,每日予LOM 60mg/kg灌胃,CON组和DM组采用等量生理盐水灌胃。于第4,8,12wk分别行HE、透射电镜、TUNEL检测RGCs的凋亡情况,同时采用激光共聚焦显微镜检测RGCs内钙离子的浓度。

结果:(1)形态学观察:随病程延长,逐渐出现RGCs数量减少、细胞排列紊乱的病理改变。透射电镜下可见DM组RGCs出现不同阶段的凋亡征象,且随病程延长逐渐加重。LOM组与同期DM组对比,在第8,12wk时RGCs凋亡征象减弱。(2)TUNEL检测:CON组大鼠视网膜神经节细胞层未见凋亡细胞。DM组4wk时视网膜神经节细胞层偶见TUNEL阳性细胞,并随病程延长逐渐增多,凋亡指数与同期CON组比较明显升高,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。LOM组8,12wk时,与同期DM组比较,染色阳性的RGCs明显减少,凋亡指数明显下降,差异显著( $P < 0.01$ )。(3)激光共聚焦显微镜钙离子浓度检测:DM组与同期CON组比较:DM组8,12wk的RGCs内钙

离子荧光染色强度明显升高,有显著差异( $P<0.01$ )。LOM组与同期DM组比较:LOM组8,12wk的RGCs内钙离子荧光染色强度明显下降,差异有统计学意义( $P<0.01$ )。

**结论:**LOM对糖尿病大鼠早期RGCs的凋亡具有保护作用。

**关键词:**糖尿病视网膜病变;视网膜神经节细胞;凋亡;钙离子浓度;洛美利嗪

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2014.04.05

**引用:**谷瑞东,郝莹莹,陈晓隆.洛美利嗪对糖尿病早期大鼠视网膜神经节细胞的保护作用.国际眼科杂志2014;14(4):593-598

## 0 引言

糖尿病(diabetes mellitus, DM)的临床和实验研究结果显示在未出现视网膜微血管病理改变之前,就有神经视网膜的损伤,继而出现视网膜功能改变<sup>[1-4]</sup>。视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)是视网膜唯一的视觉信息输出元件,研究其在糖尿病早期的变化尤显重要。洛美利嗪(lomerizine, LOM)作为一种新型钙离子通道阻断剂,可以通过减少钙离子内流,改善眼内微循环,从而起到神经保护作用<sup>[5]</sup>。本研究的目的是观察LOM对糖尿病早期RGCs凋亡的保护作用,为防治糖尿病早期视网膜神经损伤提供实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 动物与试剂** 成年雄性Sprague-Dawley(SD)大鼠120只,体重210~250g,由中国医科大学动物部提供。链脲佐菌素(美国Sigma公司),洛美利嗪(美国Sigma公司),Fluo-3, AM ester(美国Biotium公司),原位细胞凋亡检测试剂盒(武汉博士德生物技术有限公司),DAB显色剂(福州迈新生物技术有限公司),一次性血糖试纸、一次性尿糖试纸(美国Lifesan公司)。

**1.1.2 主要仪器设备** 透射电镜(日本电子株式会社),微量快速血糖仪OneTouch II型(美国Lifescan公司),震荡切片机(美国WPI公司),激光共聚焦显微镜(日本奥林帕斯有限公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 动物分组及处理** STZ按60mg/kg一次性腹腔注射诱导糖尿病模型:STZ溶解于0.1mmol/L、pH≈4.5的无菌柠檬酸钠溶液中,浓度为1%,给药前大鼠禁食水12h。模型建立标准:给药后48h剪尾法测血糖、尿糖试纸测尿糖,血糖>16.7mol/L,尿糖+++以上者为建模成功。成模后检测:每2wk测1次非空腹血糖。

将大鼠用随机数字表法分为对照组(CON)、糖尿病组(DM)和洛美利嗪组(LOM),DM组和LOM组大鼠按STZ 60mg/kg一次性腹腔注射诱导糖尿病模型,CON组给予等量无菌柠檬酸钠溶液腹腔注射。糖尿病鼠模型成模后,LOM组每日予LOM 60mg/kg灌胃,CON组和DM组采用等量生理盐水灌胃,于第4,8,12wk三个时间点进行观察,每组40只鼠。

**1.2.2 石蜡切片的制备及HE染色** 水合氯醛麻醉大鼠,快速摘除大鼠左眼眼球,置4%多聚甲醛中固定30min。在显微镜下,于角膜缘后约1mm,沿角膜缘环形剪开,祛除角膜、晶状体及玻璃体,剩余“眼杯”浸入4%多聚甲醛溶液中继续固定2h。“眼杯”经石蜡包埋后,以平行于角

膜至视乳头的矢状位切片。分别于3个平面切片,每个平面间隔75 $\mu$ m,厚度为5 $\mu$ m,连续切6次,共18张。常规苏木精-伊红染色、梯度乙醇脱水、二甲苯透明、封片、光镜下观察并拍照。

**1.2.3 透射电镜下视网膜超微结构的观察** 取出左眼的大鼠,以4%多聚甲醛与2.5%戊二醛混合液进行心脏灌注。眼球固定后,快速取出大鼠右眼球,刺破角膜,沿角膜缘剪除角膜、去除晶状体,放入2.5%戊二醛溶液中固定,4 $^{\circ}$ C条件保存。取出标本,显微镜下将“眼杯”制作成1.5 $\times$ 2mm的组织条,选择位于视乳头周围1~3mm组织,标记后送电镜室,由专科技术人员进行后固定、脱水、浸透与包埋及超薄切片的制作及染色等,透射电镜下观察。

**1.2.4 TUNEL法原位检测凋亡细胞** 石蜡切片常规脱蜡脱水,用末端脱氧核糖核酸转移酶反应液37 $^{\circ}$ C孵育,用抗体稀释液1:100稀释生物素化抗地高辛抗体,混匀后加至标本片,置37 $^{\circ}$ C湿盒内反应30min,用抗体稀释液1:100稀释SABC,混匀后加至标本片,置37 $^{\circ}$ C湿盒内反应30min,DAB显色,Mayer苏木素轻度复染细胞核15~30s,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,显微镜观察。视网膜神经节细胞凋亡指数计算方法:凋亡指数=凋亡细胞/同一视野细胞总数 $\times$ 100%。每个标本随机抽取三张切片,每张切片高倍镜下随机选取5个视野计数,计算取平均值,作为该标本的凋亡指数。每组中5个标本的结果取平均值,作为该组的凋亡指数。

**1.2.5 激光共聚焦显微镜观察细胞内钙离子浓度** 大鼠乙醚麻醉、剥除眼球后,显微镜下轻柔分离视网膜,并置于事先准备好的保存溶液中(溶液配比见下方)。将2%低熔点琼脂放入含有视网膜的保存溶液中(保持温度在37 $^{\circ}$ C~39 $^{\circ}$ C),并立即置于冰袋上。将含有视网膜标本的琼脂块用生物胶粘在震荡切片机平台上,用上述冰冻的保存溶液浸没震荡切片机平台及琼脂块,以50 $\mu$ m厚度连续切片,切片标本放于冰冻的保存溶液中并持续通氧<sup>[6]</sup>。将视网膜切片标本置于含有浓度为5mM的FLUO-3的共聚焦皿中,放入37 $^{\circ}$ C孵育箱中1h(持续通氧),取出后用保存溶液冲洗切片3次,送实验室由专业人员检测。用OLYMPUS FLUOVIEW 3.1a Viewer软件拍摄图片并进行钙离子浓度的测定。每个标本选取5张切片,每张切片选取染色明显、细胞形态清晰的RGCs,测量的平均数值进行荧光染色强度的对比,即细胞内钙离子浓度的变化。保存溶液配比:(单位:mM)NaCl 130, KCl 5, CaCl<sub>2</sub> 2, MgCl<sub>2</sub> 1, HEPES 10, glucose 20, 用1M NaOH调节溶液最终pH值为7.4。

统计学分析:采用SPSS 12.0统计软件包进行统计分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,不同时间点组间比较采用单因素方差分析。造模后TUNEL染色阳性细胞率的比较采用析因设计的方差分析,组间均数的两两比较采用LSD-*t*检验, $P<0.05$ 为组间差异有统计学意义, $P<0.01$ 为有显著统计学意义。

## 2 结果

**2.1 大鼠模型的体重、血糖变化情况** CON组:每日饮水量、尿量正常,体重随鼠龄增加呈上升趋势。随鼠龄增长,血糖无明显变化,其差异无统计学意义( $P>0.05$ )。DM组:共40只大鼠注射STZ,48h测血糖、尿糖,血糖

>16.7mol/L,尿糖+++ ,共 39 只,1 只剔除实验。按 4,8,12wk 时间点处死时测血糖,各组血糖均>16.7mol/L,其血糖值如表 1 所示,与 CON 组比较有统计学意义( $P<0.01$ ),无血糖自行恢复。每日饮水量、尿量明显多于同期对照组 2~3 倍,随鼠龄增加体重初期改变不明显,之后呈逐渐下降趋势,最终呈现消瘦状态,其体重变化如表 2 所示,与 CON 组比较有统计学意义( $P<0.01$ )。LOM 组:共 40 只大鼠注射 STZ,48h 测血糖、尿糖,血糖>16.7mol/L,尿糖+++ ,共 39 只,1 只剔除实验。成模后给予 LOM 干预,其高血糖状态无自行恢复趋势,仍然呈现多饮、多食、多尿状态,体重变化类似于 DM 组变化,呈现明显体重下降趋势。LOM 组其血糖及体重变化,于 DM 组比较各时间点均无统计学差异( $P>0.05$ ),与 CON 组比较各时间点均有统计学意义( $P<0.01$ ,表 1,2)。

**2.2 视网膜组织形态病理学观察** CON 组大鼠光镜下可见视网膜各层细胞层次清楚、排列整齐。与同期 CON 组相比,DM 组 4,8wk 大鼠视网膜结构形态变化无明显差异。DM 组 12wk 的视网膜神经节细胞层变化明显,较同期 CON 组细胞间距增大、数目减少,内核层相对变薄。LOM 组 4,8wk 大鼠视网膜结构形态变化,与同期 DM 组相比无明显差异。LOM 组 12wk 的视网膜神经节细胞层,较同期 DM 组细胞间距小、数目多,内核层相对厚(图 1)。

**2.3 透射电镜观察视网膜超微结构** CON 组:视网膜神经节细胞核大,电子密度低,细胞器丰富,可见线粒体、内质网及核蛋白体等结构,线粒体结构正常、无肿胀、可见线粒体嵴。DM 组视网膜超微结构,与同期 CON 组相比:4wk 多数 RGCs 超微结构无明显改变,少数细胞内可见线粒体肿胀、线粒体嵴模糊不清、变短;8wk RGCs 内肿胀的线粒体更为明显、数目增多,染色质边集于核膜周边,部分细胞体积缩小、细胞器减少;12wk RGCs 出现不同阶段的凋亡征象,如 RGCs 体积变小,核膜分辨不清,甚至出现细胞核断裂。LOM 组视网膜超微结构,与同期 DM 组相比:4wk 变化不明显;8wk RGCs 内肿胀的线粒体数目减少,染色质边集减少,细胞体积无明显缩小;12wk RGCs 的凋亡征象明显减少,视网膜神经节细胞体积类似正常大小,核膜较清晰、罕见细胞核碎裂(图 2)。

**2.4 视网膜神经细胞凋亡情况** CON 组视网膜未见神经细胞凋亡;DM 组 4wk 神经节细胞层偶见零散凋亡细胞;DM 组 8wk 神经节细胞层出现明显染色阳性的凋亡细胞,凋亡细胞的细胞核呈现棕褐色或棕黄色;DM 组 12wk 视网膜神经节细胞层可见凋亡细胞增多。LOM 组 8,12wk 与同期 DM 组相比,染色阳性的凋亡细胞明显减少,如图 3 所示。

神经节细胞凋亡指数如表 3 所示,正常 CON 组凋亡指数为 0;DM 组随病程延长凋亡指数呈现上升趋势,于同期 CON 组比较:DM 组 4wk 无明显变化;DM 组 8,12wk 均出现凋亡指数的升高,差异有统计学意义( $P<0.01$ )。LOM 组随病程延长凋亡指数下降,于同期 DM 组比较:LOM 组 4wk 无明显变化;LOM 组 8,12wk 均出现凋亡指数的下降,差异有统计学意义( $P<0.01$ )。

**2.5 视网膜神经节细胞内钙离子浓度变化** 三组在 4wk 时比较,RGCs 内钙离子荧光染色强度比值变化无统计学差异( $P>0.05$ )。在 8,12wk 时 DM 组与同期 CON 组比较,RGCs 内钙离子荧光染色强度明显升高( $P<0.01$ ),

表 1 不同时间点各组大鼠血糖值的比较

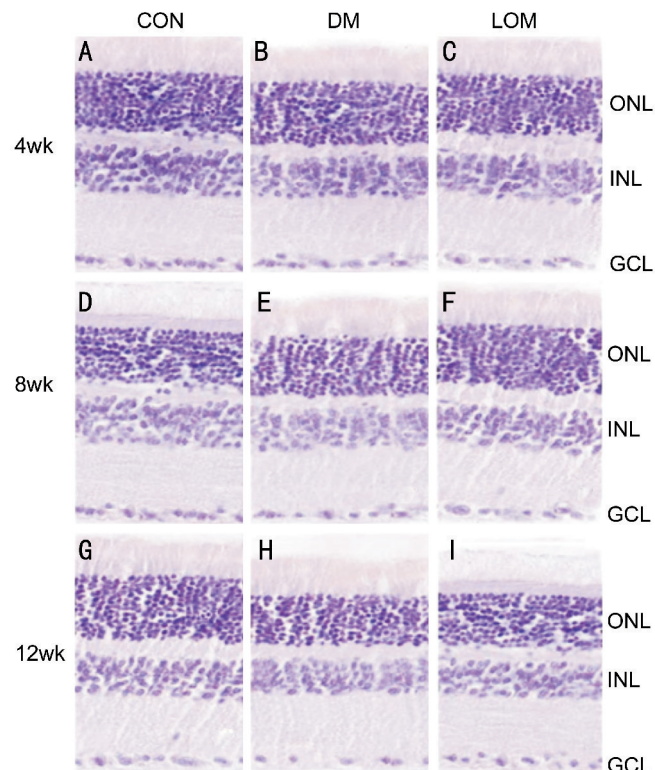
组别	$(n=13, \bar{x} \pm s, \text{mmol/L})$		
	4wk	8wk	12wk
CON	5.62±0.71	5.84±0.96	5.47±0.25
DM	26.98±4.53 <sup>b</sup>	27.03±6.34 <sup>b</sup>	27.55±3.97 <sup>b</sup>
LOM	27.43±5.56 <sup>b</sup>	26.78±3.42 <sup>b</sup>	27.36±4.77 <sup>b</sup>

<sup>b</sup> $P<0.01$  vs CON 组。

表 2 不同时间点各组大鼠体重值的比较  $(n=13, \bar{x} \pm s, \text{g})$ 

组别	$(n=13, \bar{x} \pm s, \text{g})$		
	4wk	8wk	12wk
CON	258.41±8.72	362.54±9.86	407.87±13.25
DM	262.13±7.98	247.69±8.32 <sup>b</sup>	234.56±14.28 <sup>b</sup>
LOM	257.43±10.05	250.11±8.45 <sup>b</sup>	237.12±9.48 <sup>b</sup>

<sup>b</sup> $P<0.01$  vs CON 组。

图 1 大鼠视网膜 HE 染色( $\times 400$ )。

且呈时间依赖式递增。在 8,12wk 时 LOM 组与同期 DM 组比较,细胞内钙离子荧光染色强度比值明显降低,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。在 8,12wk 时 LOM 组与同期 CON 组比较,细胞内钙离子荧光染色增强,差异具有统计学意义( $P<0.05$ ,图 4,表 4)。

CON 组各时间点 RGCs 内钙离子荧光染色强度比值组内比较无明显改变。DM 组 8,12wk 与 4wk 相比较,RGCs 内钙离子荧光浓度逐渐升高,荧光染色强度比值的升高具有统计学意义( $P<0.01$ );DM 组 12wk 与 8wk 相比较,RGCs 内钙离子荧光浓度逐渐升高,荧光染色强度比值的升高具有统计学意义( $P<0.05$ )。LOM 组 8,12wk 与 4wk 相比较,细胞内钙离子荧光染色强度逐渐升高,荧光染色强度比值的升高具有统计学意义( $P<0.05$ );LOM 组 12wk 与 8wk 相比较,所示钙离子荧光染色强度略升高,差异无统计学意义( $P>0.05$ ,表 5)。

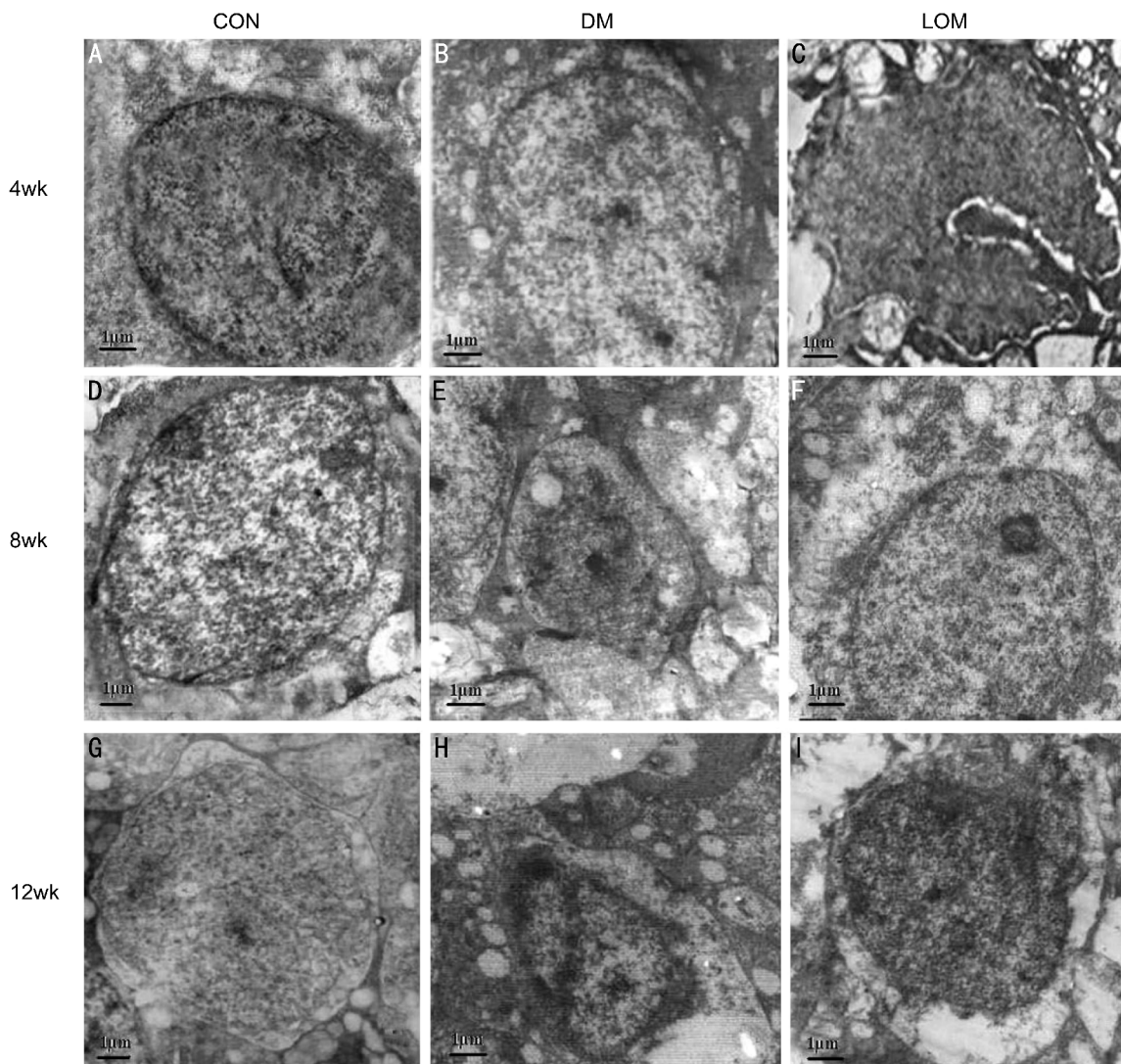


图2 大鼠视网膜神经节细胞透射电镜图片(×15K)。

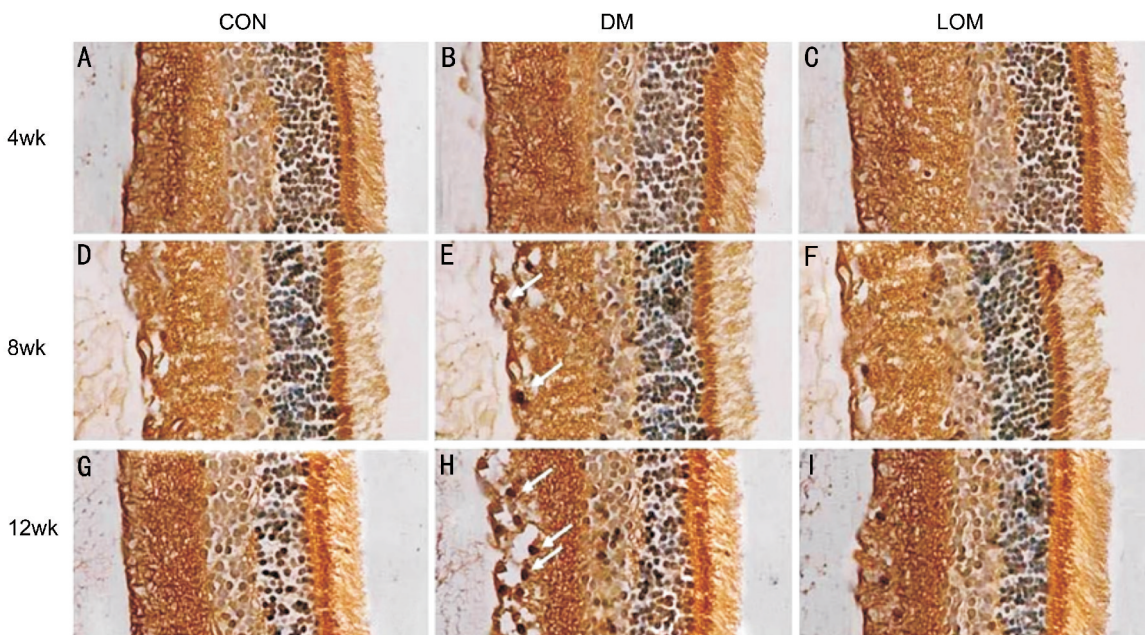


图3 大鼠视网膜 TUNEL 标记(×400)。

### 3 讨论

本实验证实糖尿病早期大鼠 RGCs 发生了凋亡,最早发生于成模后第 4wk,并且随病程延长凋亡细胞逐渐增

多。DM 组内 4,8,12wk 组每两组之间比较,呈现出细胞内钙离子浓度逐渐增高的趋势。电压门控性钙通道和配体门控性钙通道是最重要的增加钙离子浓度的两大因素<sup>[7]</sup>,

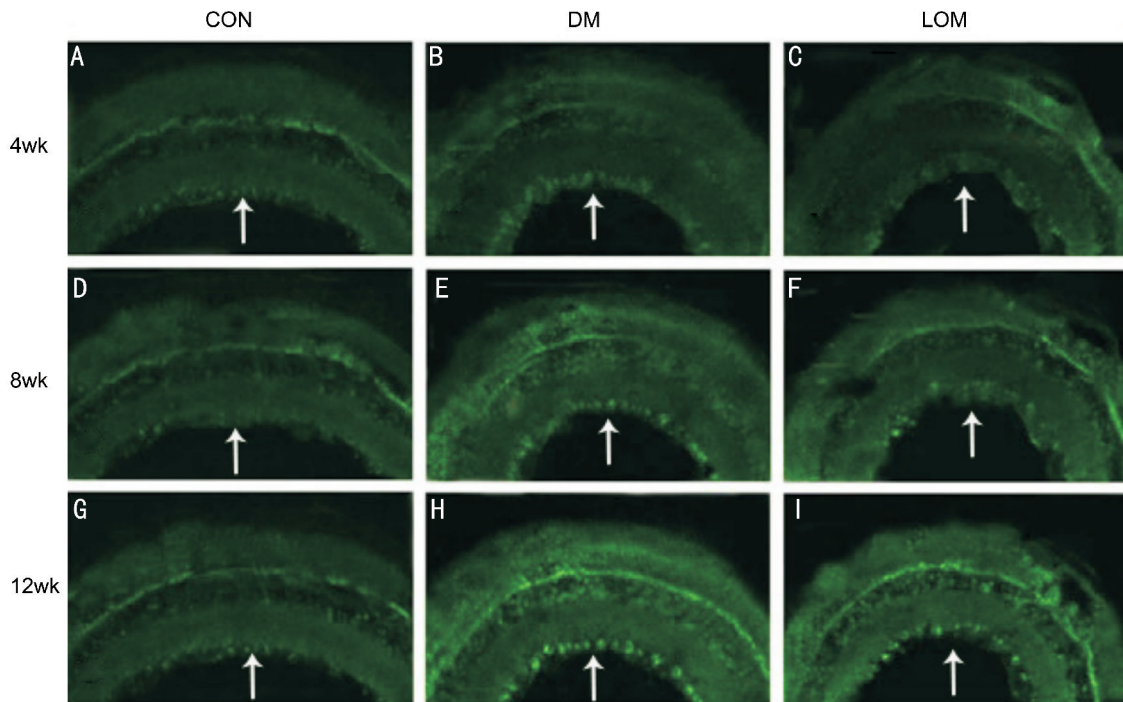


图4 大鼠视网膜 FLUO-3AM 染色 ( $\times 200$ )。

表3 不同时间点各组视网膜神经节细胞凋亡指数的比较

( $n=5, \bar{x} \pm s, \%$ )

组别	4wk	8wk	12wk
CON	0	0	0
DM	$0.02 \pm 1.8$	$4.2 \pm 2.7^b$	$7.9 \pm 5.5^b$
LOM	$0.06 \pm 8.6$	$0.13 \pm 3.6^d$	$0.22 \pm 7.2^d$

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs CON 组; <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs DM 组。

表4 不同时间点各组 RGCs 内钙离子荧光染色强度比值

( $n=8, \bar{x} \pm s$ )

时间(wk)	CON 组	DM 组	LOM 组
4	$1058.97 \pm 74.99$	$1074.40 \pm 91.87$	$1074.57 \pm 92.17$
8	$1053.18 \pm 73.03$	$1394.21 \pm 230.26^b$	$1221.49 \pm 234.06^{a,c}$
12	$1054.54 \pm 72.07$	$1450.76 \pm 223.31^b$	$1237.15 \pm 234.59^{a,d}$

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs CON 组; <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs CON 组; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs DM 组; <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs DM 组。

表5 不同时间点各组 RGCs 内钙离子荧光染色强度比值

( $n=8, \bar{x} \pm s$ )

组别	4wk	8wk	12wk
CON	$1058.97 \pm 74.99$	$1053.18 \pm 73.03$	$1054.54 \pm 72.07$
DM	$1074.40 \pm 91.87$	$1394.21 \pm 230.26^b$	$1450.76 \pm 223.31^{b,c}$
LOM	$1074.57 \pm 92.17$	$1221.49 \pm 234.06^a$	$1237.15 \pm 234.59^a$

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs LOM 组 4wk 时; <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs DM 组 4wk 时; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs DM 组 8wk 时。

并且已经证明在 RGCs 上存在多种钙通道<sup>[8]</sup>, 包括电压门控性钙通道(T、P、Q、L、N 型)和配体门控性钙通道(主要是谷氨酸受体钙通道)。

糖尿病早期大鼠 RGCs 内钙离子浓度升高机制可能为:(1) 谷氨酸神经毒性作用。糖尿病视网膜病变时, 由于发生代谢的异常, 导致谷氨酸浓度升高, 过多的谷氨酸通过 N-甲基-D-天(门)冬氨酸(NMDA)受体通路介导,

引起线粒体内的钙离子堆积和线粒体去极化, 去极化的线粒体反过来促使依赖钙离子内流的受体激动, 过多的钙离子激活了钙敏感酶、蛋白激酶、一氧化氮合酶, 从而引起一系列的神毒性作用<sup>[9]</sup>。(2) 电压门控性钙通道。电压门控性钙通道和配体门控性钙通道并不是相互孤立的, 谷氨酸受体钙通道可以促进电压门控性钙通道进一步增加钙离子内流, 共同导致细胞内的钙离子浓度增加<sup>[10]</sup>。

LOM, 作为一种新型钙离子阻断剂, 不但能拮抗谷氨酸引起的兴奋毒性, 而且还可以阻断 L 型和 T 型电压依赖性钙通道, 从而同时抑制了电压门控性钙通道和配体门控性钙通道—两大最主要的增加钙离子内流的因素。本实验给予 LOM 干预后, 与同期 DM 组相比较, 大鼠 RGCs 内钙离子浓度明显下降, 凋亡细胞明显减少, 证明了 LOM 在糖尿病鼠模型早期对 RGCs 的保护作用。

LOM 对 RGCs 的保护作用, 分析其机制可能为:(1) LOM 可以增加眼部血液循环, 并且对血压、心率的影响非常轻微<sup>[11]</sup>; (2) LOM 可以通过减少钙离子内流, 拮抗谷氨酸引起的兴奋毒性<sup>[5,12]</sup>; (3) LOM 是 L 型和 T 型电压门控性钙通道阻断剂, 有可能通过阻断由电压门控性钙通道引起的钙离子内流, 从而减轻钙离子超载, 达到保护 RGCs 的作用<sup>[13]</sup>; (4) LOM 可以减少磷酸酶的表达、减少氧化应激反应, 并且早期可以增加巨噬细胞的数量<sup>[13]</sup>; (5) LOM 影响 Caspase-3 的表达<sup>[14]</sup>。

值得一提的是: 从 LOM 组与 CON 组相比较的结果来看, LOM 组 8, 12wk RGCs 内钙离子荧光染色强度高于同期 CON 组, 荧光染色强度比值的升高具有统计学意义, 说明单纯的 LOM 治疗, 并不能完全恢复 RGCs 正常的钙离子浓度, 可能还需要联合治疗。

综上,在糖尿病早期 RGCs 就出现了 RGCs 内钙离子浓度的升高,LOM 对糖尿病大鼠早期模型进行干预后,降低了 RGCs 内钙离子浓度,减少了 RGCs 凋亡的发生,对 RGCs 起到了保护作用,说明了细胞内钙离子浓度的升高是导致神经节细胞凋亡的机制之一,可为临床上药物治疗提供理论依据。

#### 参考文献

- 1 Simó R, Hernández C. Neurodegeneration in the diabetic eye: new insights and therapeutic perspectives. *Trends Endocrinol Metab* 2013;25(1):23-33
- 2 Stem MS, Gardner TW. Neurodegeneration in the pathogenesis of diabetic retinopathy: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Curr Med Chem* 2013; 20(26):3241-3250
- 3 Simó R, Hernández C. Neurodegeneration is an early event in diabetic retinopathy: therapeutic implications. *Br J Ophthalmol* 2012; 96(10):1285-1290
- 4 Villarroel M, Ciudin A, Hernández C, et al. Neurodegeneration: An early event of diabetic retinopathy. *World J Diabetes* 2010 ;1(2):57-64
- 5 Toriu N, Akaike A, Yasuyoshi H . Lomerizine, a Ca<sup>2+</sup> channel blocker, reduces glutamate - induced neurotoxicity and ischemia/reperfusion damage in rat retina. *Exp Eye Res* 2000;70(4):475-484
- 6 Schmid S, Guenther E. Voltage - activated calcium currents in rat retinal ganglion cells in situ: changes during prenatal and postnatal development. *J Neurosci* 1999;19(9):3486-3494

- 7 Pancani T, Phelps JT, Searcy JL, et al. Distinct modulation of voltage-gated and ligand-gated Ca<sup>2+</sup> currents by PPAR - gamma agonists in cultured hippocampal neurons. *J Neurochem* 2009;109(6):1800-1811
- 8 Lilley S, Robbins J. The rat retinal ganglion cell in culture: an accessible CNS neurone. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2005; 51(3):209-220
- 9 林丁,陈琛. 青光眼的视网膜神经节细胞损伤及其保护. *中华眼科杂志* 2005;41(12):1144-1148
- 10 Lorenzi M. The polyol pathway as a mechanism for diabetic retinopathy: attractive, elusive, and resilient. *Exp Diabetes Res* 2007; 2007:61038
- 11 Hara H, Toriu N, Shimazawa M. Clinical potential of lomerizine, a Ca<sup>2+</sup> channel blocker as an anti - glaucoma drug: effects on ocular circulation and retinal neuronal damage. *Cardiovasc Drug Rev* 2004; 22(3):199-214
- 12 Ito Y, Nakamura S, Tanaka H, et al. Lomerizine, a Ca<sup>2+</sup> channel blocker, protects against neuronal degeneration within the visual center of the brain after retinal damage in mice. *CNS Neurosci Ther* 2010;16(2):103-114
- 13 Fitzgerald M, Bartlett CA, Evill L, et al. Secondary degeneration of the optic nerve following partial transection: the benefits of lomerizine. *Exp Neurol* 2009;216(1):219-230
- 14 Fitzgerald M, Payne SC, Bartlett CA, et al. Secondary retinal ganglion cell death and the neuroprotective effects of the calcium channel blocker lomerizine. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(11):5456-5462